

## Valor de la expresión del ARN mensajero de la isocitrato deshidrogenasa (IDH1) como predictor de agresividad en gliomas

M. Sampol López<sup>2</sup>, M. Brell Doval<sup>3</sup>, R. Guevara de Bonis<sup>2</sup>, J. Ibáñez Domínguez<sup>3</sup>,  
M. E. Couce Matovelle<sup>1</sup>,

1- Servicio de Anatomía Patológica

2- Biobanco HUSE

3- Servicio de Neurocirugía

Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca

### Resumen

Los gliomas son el tipo más común de tumor cerebral primario. En humanos, cinco genes codifican para la isocitrato deshidrogenasa: IDH1/2/3A/3B/3G. Mutaciones somáticas puntuales en el gen IDH1 son frecuentes en gliomas, la mayoría transiciones de una sola base: 395G-A y están asociadas a una mayor supervivencia de esos pacientes con glioma cuando los comparamos con aquellos que no tienen la mutación. Entre las consecuencias funcionales de la mutación de la IDH1, estudios demuestran un fuerte descenso en la producción de NADPH reducido dependiente de isocitrato en las células.

Investigamos la expresión del ARNm del IDH1 y la presencia o ausencia de la mutación G395A en una serie de gliomas. En particular, estudiamos 38 casos de gliomas y 7 metástasis analizando el centro y la periferia de muestras en fresco y resección en bloque.

No encontramos diferencias entre las regiones central y periférica con respecto a la expresión del ARNm y la mutación de IDH1. Sin embargo, podemos observar una mayor expresión del ARNm de IDH1 y una menor incidencia de la mutación en tumores de alto grado cuando los comparamos con aquellos de bajo grado.

Este estudio muestra que los gliomas con IDH1 normal tienen una mayor expresión de ARNm independientemente de la zona del tumor. Esto podría conducir a un aumento en la actividad enzimática y mayor presencia de NADPH, lo cual se necesita para el crecimiento celular. Así, el mayor poder de reducción de estas células podría explicar la mayor agresividad de estos gliomas.

*Palabras Clave:* glioma, expresión IDH1, mutación IDH1, resección en bloque.

### Abstract

Gliomas, are the most common type of primary brain tumors. In humans, five genes encode for isocitrate dehydrogenase: IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B, and IDH3G. Somatic point mutations in IDH1 are frequent in gliomas. Most mutations for IDH1 are single base transition substitutions: 395G\_A and are associated with longer survival in patients with glioma when compared with those gliomas without IDH1 mutations. Among the functional consequences of IDH1 mutation, some studies have shown a strong decrease in the isocitrate dependent production of reduced NADPH production in the cells.

We investigated mRNA expression of IDH1 and the presence or absence of the G395A mutation in a subset of gliomas. Specifically, we studied 38 cases of glioma and 7 methastasis analyzing central and peripheral regions from fresh and en block resection specimens. We found no differences between central and peripheral regions, in regard to IDH1 mRNA expression and G395A IDH1 mutation. However, we identified a significantly higher expression of IDH1 mRNA and a lesser incidence of mutation in high grade gliomas when compared with low grade ones. This study shows that those gliomas with IDH1 WT are associated with higher expression of IDH1 mRNA, independently of the tumor area. This could in turn lead to an increase in enzyme activity and more presence of NADPH which is needed for cellular growth. The greater reducing power in these cells could account for the greater aggressiveness of these gliomas.

*Key words:* glioma, IDH1 expression, IDH1 mutation, block resection.

## Correspondencia

Hospital Universitario Son Espases  
Carretera de Valldemossa 79  
07010 Palma de Mallorca  
Islas Baleares - Spain  
Teléfono: 871 20 50 50

## Introducción

Los gliomas son los tumores cerebrales más frecuentes, e incluyen una gran variedad de tipos histológicos y grados de malignidad según la clasificación de la OMS<sup>1</sup>, siendo responsables de aproximadamente 13.000 muertes al año.

El diagnóstico y el tratamiento de los gliomas varían en función del tipo de tumor, su agresividad y su localización. En general, los gliomas de grado I clasificados por la OMS, se consideran benignos, siendo curables mediante resección quirúrgica completa y muy raramente, evolucionan a lesiones de mayor grado<sup>2</sup>. Por otra parte, los gliomas de grado II y III son invasivos, progresan hacia lesiones mayores y tienen mal pronóstico. A pesar de los avances en técnicas quirúrgicas, radioterapia y quimioterapia, los gliomas de grado IV (glioblastomas), que son la forma más invasiva, siguen teniendo muy mal pronóstico<sup>3,4</sup> generalmente debido a la adquisición de quimioresistencia por parte de las células neoplásicas. El agente quimioterápico más usado, la temozolamida (TMZ), es un agente alquilante, cuya acción radica en bloquear el ciclo celular mediante una acción directa sobre el ADN nuclear e induciendo apoptosis. La meta de muchas líneas de investigación es la de conseguir influir sobre la sensibilidad de las células neoplásicas a estas terapias.

En los últimos años, una molécula crucial en la generación de poder reductor celular, el enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), en particular su isoforma IDH1, se ha asociado de forma muy directa a los gliomas. En el año 2008 se descubre, a través de un estudio de secuenciación genómica, que el 12% de sus GBM presentan mutaciones en el gen de la IDH<sup>12</sup>.

La mutación del gen IDH1 ha sido identificada en la mayoría de gliomas astrocíticos de grado II y grado III, oligodendrogliomas y gliomas oligoastrocíticos, sugiriendo un evento inicial común entre estos tumores histológica y biológicamente tan diversos<sup>5, 6</sup>, con incidencias de hasta un 75% en grados II y III así como en glioblastomas secundarios, asociándose con

una mejor supervivencia en estos pacientes, datos acordes con los obtenidos en nuestra población de estudio<sup>7</sup>.

La IDH1, que se encarga de transformar el Isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato mediante descarboxilación oxidativa<sup>8</sup>, tiene tres isoformas. Las isoformas 1 y 2 utilizan nicotinamin adenina dinucleótido fosfato (NADP) como cosustrato mientras que la isoforma 3 requiere de nicotinamin adenina dinucleótido (NAD). La mutación de la IDH1, en el codón G395A, se traduce en el aminoácido arginina situado en la posición 132 de la proteína y situado en el centro activo del enzima donde tiene lugar la conversión del sustrato. Además, la IDH1 mutada usa  $\alpha$ -cetoglutarato como sustrato para producir 2-hidroxiglutarato y resulta en una fuerte disminución en la producción del NADPH, poder reductor para muchas rutas biosintéticas.

Además, la mutación R132 del IDH1 se ha visto que favorece una nueva conformación activa del enzima incrementando su afinidad por el NADPH favoreciendo aún más la reducción de  $\alpha$ -cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato, lo cual reduce la disponibilidad del  $\alpha$ -cetoglutarato citosólico y de NADPH<sup>9</sup>.

Hay estudios recientes que han examinado si la mutación o el estatus del IDH1 en gliomas puede predecir la respuesta al tratamiento en estos pacientes; si las mutaciones del IDH1 tienen un valor predictivo en diferentes subgrupos de glioma o si son indicativos de un régimen de tratamiento específico todavía se desconoce y requiere investigación adicional<sup>10</sup>.

Por otra parte, los perfiles de expresión proporcionan un método objetivo para clasificar los tumores<sup>11, 12</sup>. Hasta ahora, estudios previos han demostrado que los perfiles de expresión se correlacionan mejor con el pronóstico que la histología<sup>13</sup> e incluso se puede utilizar para predecir el pronóstico de los pacientes<sup>14</sup>.

La expresión de IDH1 también se ha correlacionado con el grado histológico y el subtipo de glioma, yaunque es sabida la capacidad de invasión de estos tumores, no existen estudios previos sobre la expre-

sión de este gen que comparen las regiones centrales y marginales del tumor. Utilizando un modelo de estudio bien caracterizado en nuestro grupo, analizamos regiones distantes (central y periférica) procedentes de resecciones en bloque de gliomas. Así, con la intención de profundizar en el conocimiento sobre la heterogeneidad de los gliomas, uno de los objetivos de nuestro estudio ha sido analizar las diferencias de expresión del gen IDH1 entre las regiones centrales y periféricas de estos tumores.

## Material y métodos

### *Muestras tumorales*

En primer lugar, los pacientes del estudio fueron admitidos en el servicio de neurocirugía donde se determinaron candidatos a resección tumoral completa.

La obtención de muestras tumorales de pacientes diagnosticados de tumor cerebral se realizó en nuestro hospital (Hospital Universitario Son Espases, HUSE), con un protocolo bien estipulado para la obtención y manejo de dichas muestras. Se estudiaron un total de 45 casos entre los que encontramos: 7 gliomas de bajo grado, 25 astrocitomas de alto grado, 6 gliomas con componente oligodendrogial y 7 metástasis, todos ellos clasificados según la OMS.

Los criterios de inclusión y exclusión que se utilizaron para este fin fueron:

### *Criterios de Inclusión:*

Grupo A (Experimental / Glioma): Pacientes adultos, diagnosticados de tumor cerebral y candidatos a cirugía después de su evaluación multidisciplinar por el comité de Neurooncología del HUSE, que durante la intervención quirúrgica se diagnosticaron de glioma por estudio histopatológico intraoperatorio, sin historia clínica previa significativa, y que además, hayan firmado ellos mismos, o sus responsables legales, un consentimiento informado para participar en este estudio.

Grupo B (Control / Metástasis): Pacientes adultos, que son diagnosticados de tumor cerebral y son candidatos a cirugía después de su evaluación multidisciplinar por el comité de Neurooncología del HUSE, que durante la intervención quirúrgica se diagnosticaron de tumor metastásico por estudio histopatológico intraoperatorio, sin historia clínica previa significativa, y que además, ellos mismos o sus responsa-

bles legales firman un consentimiento informado para participar en este estudio.

### *Criterios de Exclusión:*

- 1) Evidencia previa de no adherirse a otros procedimientos o protocolos médicos.
- 2) No haber firmado el consentimiento para estudio o no existir un responsable legal o familiar que pueda proveer de autorización para realizar el estudio.
- 3) A pesar de haber firmado el consentimiento para participar en este estudio, haber revocado su consentimiento tras la cirugía.
- 4) No ser posible distinguir la región periférica de la central en la pieza de resección tumoral.
- 5) El material reservado para diagnóstico neuropatológico no es considerado representativo y es necesaria la utilización del material congelado para su evaluación histopatológica.

### *Protocolo de muestreo:*

El material de estudio consistió en: la revisión de información obtenida de los historiales clínicos/ base de datos informatizada, de los sujetos de estudio. Y la utilización de material excedente del necesario para fines diagnósticos, siguiendo en todos los casos el siguiente protocolo:

-El Neuropatólogo tomó muestras periféricas y centrales (de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>) para realizar impronta y extensiones que sirvieran para su diagnóstico intraoperatorio. (Fig. 1)

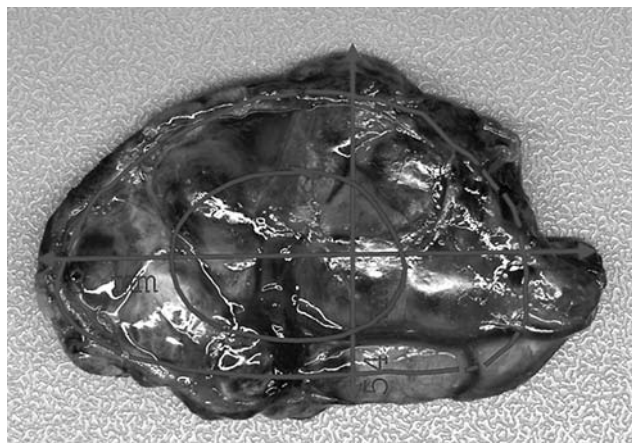
-Se valoraron los márgenes y se procedió a la obtención de tres muestras periféricas y tres centrales, a modo de capas de cebolla, y siempre en este orden: de margen de resección quirúrgica a región central de la pieza.

Estas muestras se utilizaron para extracción de ADN, ARN y para examen histológico. (Fig. 2)

### *Análisis de mutación del IDH1*

#### *Extracción de ADN*

Para la extracción de ADN utilizamos el kit de extracción QIAmp mini kit (QIAGEN) y una vez obtenido, medimos su concentración con el espectrofotómetro NANO DROP 1000 (Thermo Fisher Scientific, Usa).



*Figura 1: Mapa de la disección del tumor.*

Valoración de las regiones del tumor. Región central, englobada por el círculo interior y región periférica, situada por fuera del círculo exterior.

#### *Amplificación por PCR*

Para la amplificación por PCR se utilizaron 20ng del ADN extraído y se amplificó un fragmento de 129 pares de bases de longitud abarcando el dominio catalítico de IDH1, el cual incluye el codón 132.

Los primers de IDH1 utilizados se encontraban a una concentración 0.4μM y fueron: primer forward F-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT y primer reverse R-GCAAAATCACATTATTGCCAAC. Utilizamos un buffer en condiciones estándar, de 20ng de ADN y Hotstart taq polimerasa (QIAGEN). Para la amplificación del fragmento de ADN se llevaron a cabo 35 ciclos para la desnaturalización a 95°C durante 30s, alineamiento a 56°C durante 40s y elongación de la cadena a 72°C durante 50s en un volumen final de 20 μl.

Los productos obtenidos de la PCR se comprobaron con electroforesis en gel de agarosa (1.5% TAE 1x) para asegurarnos del tamaño del fragmento de ADN. Por último purificamos con el kit MINI ELUTE (QIAGEN).

#### *Secuenciación del ADN*

Se utilizaron 2μl del producto de amplificación de la PCR para llevar a cabo la secuenciación utilizando el BigDyeTerminator v 3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). La cantidad de producto de amplificación de ADN estaba entre 30-50 ng a una concentración de 20-50 ng/μl. La cantidad de primer era de 3.2 pmol y una concentración de 3.2 pmol/μl. Se realizaron 25 ciclos de 96°C durante 1m, 96°C durante 10s, 50°C durante 5s y 60°C durante 4m



*Figura 2. Secciones del tumor.*

Región central en la parte inferior de la imagen y región periférica del tumor en la parte superior.

para cada muestra amplificada para cada primer (IDH1 F sq- 5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3' y IDH1 R sq- 5'-GCAAAATCACATTATTGCCAAC-3').

Las secuencias se determinaron usando el secuenciador semiautomático (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City; USA) y Chromas 2 (Technelysium Pty Ltd) software.

#### *Análisis de expresión IDH1*

##### *Extracción del ARN y RT-PCR.*

Para evaluar los niveles de ARNm del IDH1, el ARN total fue extraído de las muestras de tejido fresco, tanto del centro como de la periferia, de los tumores a estudiar utilizando Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, SL, Basel Switzerland)), de acuerdo con el protocolo establecido por la casa comercial. La eficiencia y pureza de la extracción se comprobó mediante nanodrop. A continuación, 1μg de ARN total fue utilizado para la síntesis de cDNA llevada a cabo con random primers hexamers. La PCR se llevó a cabo con Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) en una 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, UK). La secuencia de los primers para la IDH1 y para los tres housekeeping genes que se utilizaron para normalizar la expresión del ARNm son: IDH1: F sq-5'-ACAGGAGACGTC-CACCAATC-3' y R sq-5'-GCTTTGCTCTGTGGGCTAAC-3'; ABL1: F sq-5'-



CAACACTGCTTCTGATGGCAA-3' y R sq-5'-CGGCCACCGTTGAATGAT-3'; HPRT1: F sq-5'-TGAGGATTTGGAAAGCGTGT-3' y R sq-5'-GAGCACACAGACGGCTACAA-3'; TBP: F sq-5'-GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3' y R sq-5'-TCTGGTTTGATCATTCTGTAG-3'.

### Análisis estadístico

Todos los análisis han sido realizados con el programa estadístico para la sociedad científica SPSS (software versión 17.0 para Windows (Chicago, IL, USA)).

Los datos han sido expresados como la media  $\pm$  S.E M. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba t de Student. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

## Resultados

45 casos fueron incluidos en dos grupos de estudio. Por un lado el grupo de gliomas, en el que se incluyeron 7 gliomas de bajo grado, 25 astrocitomas de alto grado y 6 gliomas con componente oligodendroglioma. Por otro lado, un grupo formado por 7 metástasis, cuya composición celular no es de origen cerebral por lo que se utilizaron como controles. Todos los tumores estudiados fueron clasificados según la OMS. (Fig. 3).

### Análisis de expresión del IDH1

Los 38 gliomas estudiados se clasificaron según el tipo celular (astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas), y según su grado de malignidad en

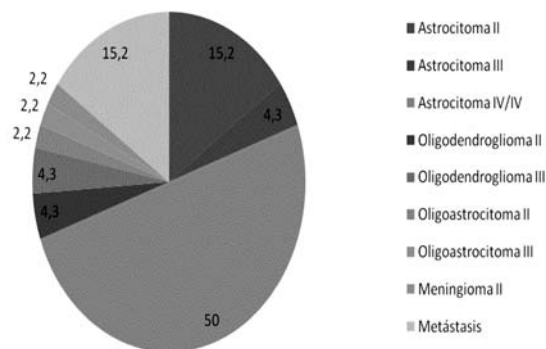


Figura 3. Casos de estudio  
Clasificación de los tumores que integran el estudio, según la OMS, en porcentajes.

alto (grados III y IV de la OMS) y bajo (grado II de la OMS). Los gliomas de alto grado (grados III y IV) mostraron una expresión del gen IDH1 dos veces superior (1.27) a la expresión observada en los gliomas de bajo grado (0.60). Estos resultados se obtuvieron al realizar una normalización de los valores de expresión de IDH1 con los genes housekeeping *abl1*, *hprt1* y *tbp*.

Respecto a las diferencias entre centro y periferia, dentro de cada grupo de estudio, se observó una mayor expresión del gen en la zona centro respecto a la zona periférica sin que llegase a ser estadísticamente significativa (Fig. 4)

Por otro lado, comparando los tumores gliales frente a los metastásicos, observamos una mayor expresión del ARN mensajero de IDH1 estadísticamente significativa, frente a la expresión del ARN mensajero de las metástasis utilizadas como control (Fig. 5)

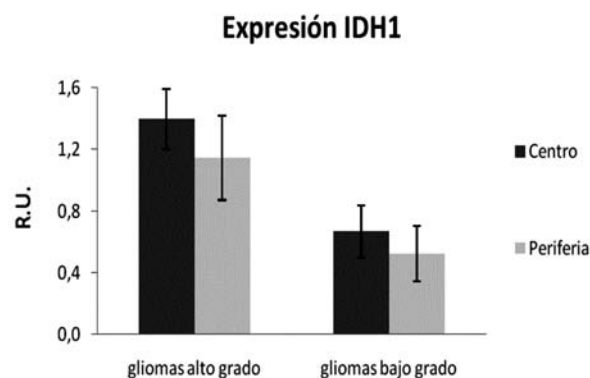


Figura 4. Expresión de IDH1  
Expresión de IDH1 en gliomas de alto y bajo grado, comparando entre el centro y la periferia de estos tumores.

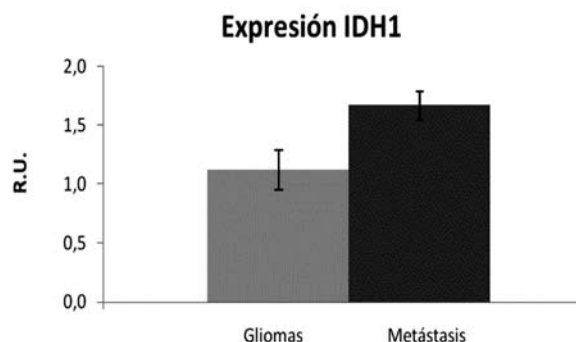


Figura 5. Expresión de IDH1  
Expresión de IDH1 en gliomas y metástasis, (grupo control).

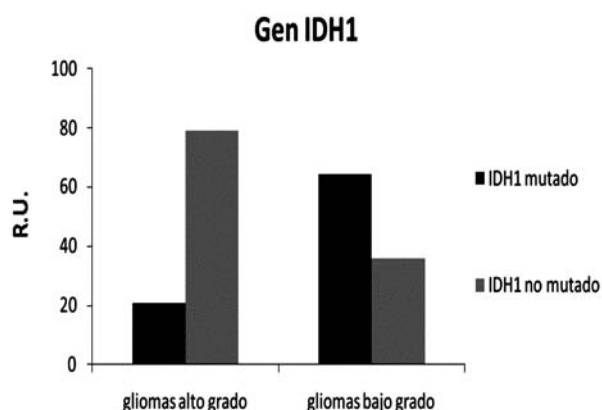


Figura 6. Determinación de la mutación G395A del gen IDH1

Determinación de la mutación G395A del gen IDH1, en gliomas de alto y bajo grado.

### Análisis de mutación del gen IDH1

En los resultados de secuenciación de la región del gen del IDH1, se observó la presencia de la mutación G395A en distinto grado dependiendo del tipo de tumor analizado. En los gliomas de alto grado se observó un 20.8% de casos mutados frente al 79.2% de gliomas no mutados. Mientras que los gliomas de bajo grado presentaron un mayor índice de casos mutados, en total un 64.3% de los gliomas analizados presentaban la mutación y sólo un 35.7% de los casos fueron no mutados. En todos los casos se observó una transición entre las bases púricas de G a A (Fig. 6).

### Análisis histológico

El examen microscópico de secciones centrales y periféricas del grupo de gliomas fue necesario para el diagnóstico de cada caso según los criterios de la OMS. En la mayoría de los gliomas de grado IV, la presencia de necrosis fue más prominente en regiones centrales, mientras que la proliferación vascular en forma de proliferación endotelial y/o presencia de vasos glomeruloides fue más marcada en regiones de la periferia tumoral.

En cuanto a la densidad de la población neoplásica, no se encontraron diferencias apreciables al examen microscópico entre regiones centrales y periféricas, tanto en gliomas de bajo como de alto grado.

En cuanto a las metástasis, el origen más común fue el pulmón y el tipo de tumor más frecuente, el adenocarcinoma. La región periférica en estas resecciones tumorales, contenían población neoplásica, neta-

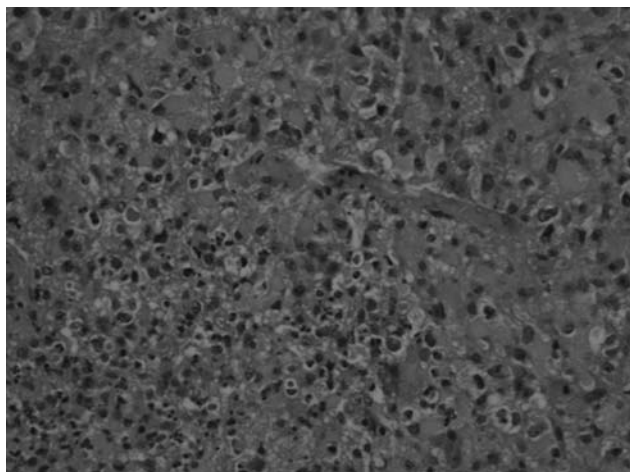
mente delimitada y una población glial reactiva adyacente; mientras que las regiones centrales estaban constituidas en su mayor parte, por células neoplásicas (Fig. 7).

### Discusión

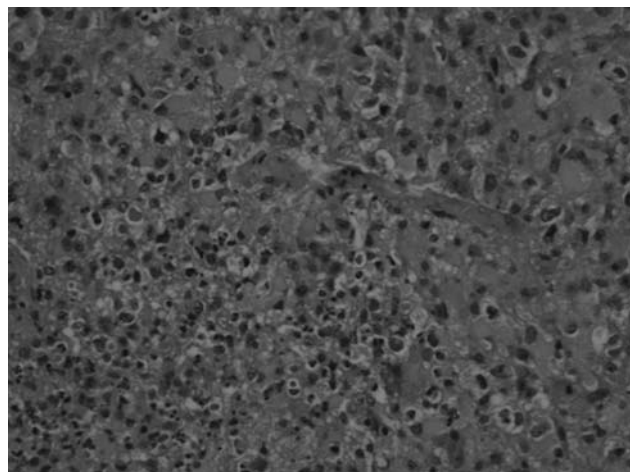
Alrededor de la mitad de los tumores cerebrales son gliomas. Los gliomas representan la tercera causa de muerte por cáncer entre los hombres de edad media, y la cuarta para las mujeres con edad comprendida entre los 15 y 34 años<sup>15</sup>.

Estos tumores presentan un amplio espectro de hallazgos patológicos que hacen difícil su clasificación, así como una historia natural diferente según su grado de malignidad; así, algunas lesiones pueden evolucionar a lo largo de años, mientras que otras progresan rápidamente y causan la muerte del paciente en pocos meses. Debido a su agresividad, es de vital importancia clasificar correctamente estos tumores, para poder establecer un pronóstico adecuado, y decidir la mejor estrategia terapéutica<sup>16</sup>.

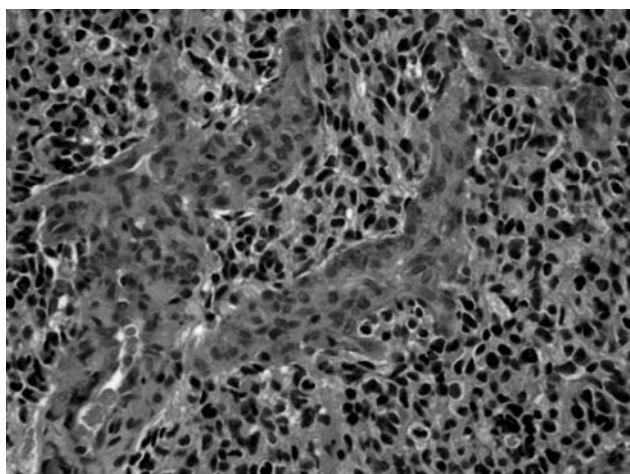
Por otro lado, los gliomas se caracterizan por ser tumores muy invasivos y heterogéneos, en los que su capacidad de infiltración del tejido adyacente varía durante el transcurso de la enfermedad<sup>25</sup>. Algunos autores proponen la distinción de dos subpoblaciones celulares (una inmóvil y proliferativa en el centro, y otra móvil e invasora en la periferia del tumor) con diferente capacidad invasora<sup>26, 27</sup>. Estas evidencias llevaron a nuestro grupo a profundizar en el estudio sobre la invasión y heterogeneidad de los gliomas. Como la mayoría de neoplasias, los gliomas se desarrollan como resultado de alteraciones genéticas que se acumulan a lo largo de la progresión tumoral. En los últimos años, diferentes estudios muestran evidencias de la participación de tanto oncogenes como genes supresores de tumores en la formación de los gliomas. Varios genes, incluyendo TP53, PTEN, CDKN2A y EGFR están alterados en gliomas<sup>17</sup>. Estas alteraciones tienden a aparecer en un orden definido en la progresión de un tumor hacia alto grado. Mutaciones en TP53 parece ser un evento relativamente temprano durante el desarrollo de un astrocitoma, mientras que la pérdida o mutación de PTEN y la amplificación de EGFR son las características de los tumores de grado superior<sup>18, 19, 20</sup>. En oligodendrogliomas, la pérdida alélica de 1p y 19q se producen en muchos de los que los tumores de grado II, mientras que las pérdidas de 9p21 se limitan esencialmente a los tumores de grado III clasificados por la OMS<sup>21</sup>.



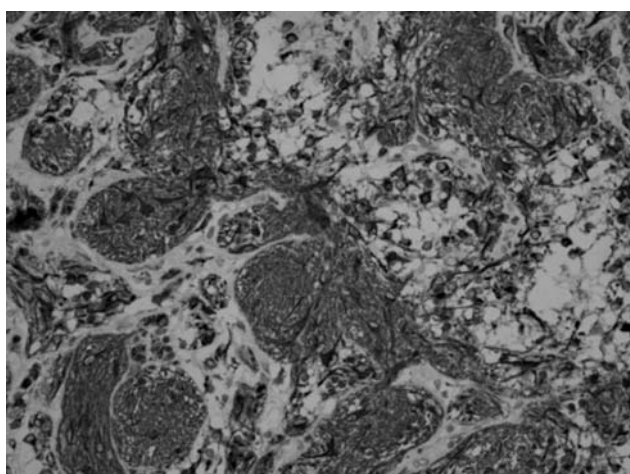
*A) Imagen microscópica (200x) de una sección central de un astrocitoma gemistocístico de alto grado (tinción hematoxilina/eosina).*



*B) Sección central de un glioma de alto grado (200x) mostrando necrosis central con empalizada nuclear periférica y presencia de mitosis atípicas.*



*C) Imagen microscópica de un glioma de alto grado (200x) mostrando proliferación vascular. Tinción de hematoxilina / eosina.*



*D) Imagen microscópica de un área periférica de un glioma de bajo grado inmunoteñido para proteína glial fibrilar ácida (GFAP).*

*Figura 7. Análisis histopatológico de cuatro casos representativos del estudio.*

En los últimos años, una molécula crucial en la generación de poder reductor celular, el enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), en particular su isozima IDH1, se ha asociado de forma muy directa a los gliomas. La secuenciación seriada de este gen en una gran serie de pacientes con GB permitió determinar una elevada frecuencia de alteraciones en el gen IDH1, localizado en el cromosoma 2q33 y encargado de codificar una enzima que cataliza la carboxilación oxidativa del isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), lo que finalmente resulta en la producción de NADPH (nicotinamida adenin dinucleótido fosfato) <sup>2, 17</sup>.

El NADPH implica poder reductor para muchas rutas biosintéticas: y para regenerar el glutatión, antioxidante no enzimático. En muchos tipos de cán-

cer se ha visto que aumenta la función glucolítica y disminuye la función de la cadena respiratoria mitocondrial en general, y en particular de la citocromo c oxidasa (COX) cuya función es fundamental en la fosforilación oxidativa (Olivá).

Nuestro grupo diseña un modelo de estudio único basado en demostrar, en un grupo reducido de gliomas, que la actividad específica COX fue significativamente mayor en fracciones mitocondriales extraídas de la periferia tumoral cuando se comparaban con aquellas procedentes de las regiones centrales del tumor<sup>28</sup>. Esta observación apunta a una capacidad oxidativa mayor en mitocondrias aisladas de la periferia comparada con aquellas centrales, donde la actividad COX fue significativamente más reducida.



Las mutaciones en el gen IDH juegan un papel central en la patogénesis de los gliomas y definen una subpoblación de tumores con particularidades biológicas que se traducen a la clínica<sup>22</sup>. Por lo que la relevancia clínica de conocer el estado de mutación de este marcador molecular (IDH1) radica en que la mutación de este gen está asociada a una mayor supervivencia de estos pacientes. Siendo los gliomas de grados II y III, así como glioblastomas secundarios los que tienen mejor pronóstico entre estos tumores.

Nuestros resultados mostraron esta mutación G395A en mayor frecuencia en los gliomas de bajo grado, lo que ayudaría en algunos casos en que se encuentran lesiones difíciles de diagnosticar únicamente con el criterio histopatológico. Otros grupos están apostando por una clasificación molecular de los gliomas analizando la expresión del ARN mensajero. Hasta ahora, estudios previos han demostrado que los perfiles de expresión se correlacionan mejor con el pronóstico que con la histología<sup>24</sup>.

Aunque es sabido que la agresividad de estos tumores se debe principalmente a su capacidad de invasión y heterogeneidad, no existen estudios previos, según nuestros conocimientos, que remarquen la importancia de las diferencias del gen IDH1 en regiones distantes en estos tumores. Así, uno de los objetivos de este estudio fue analizar las diferencias en la expresión del gen IDH1 entre las regiones centrales y periféricas de los tumores, para profundizar en el conocimiento de su heterogeneidad.

El estrés oxidativo, en condiciones normales, provoca aumento de defensas antioxidantes, de CRM y de ciclo de Krebs (ATC).

Utilizando el modelo de estudio en fresco en regiones distantes (central y periférica) procedentes de resecciones en bloque de gliomas, determinamos en muestras obtenidas en fresco de gliomas, la expresión del ANR mensajero de IDH1, con el fin de investigar si existen diferencias de expresión de este gen entre regiones distantes de gliomas y, a su vez, realizamos un estudio comparativo de expresión de IDH1 entre gliomas de alto grado y bajo grado.

Nuestros resultados mostraron que los gliomas de alto grado presentaban mayores niveles de expresión del mensajero del IDH1, lo que podría explicar en parte, esta mayor capacidad proliferativa de los gliomas de alto grado ya que mayores niveles de mensajero se corresponden con mayores niveles enzimáticos, lo que se traduce en mayor concentración de

NADPH en la célula, que confiere mayor poder de síntesis celular dando lugar a nuevas estructuras necesarias para la división celular, nuevas membranas, proteínas y multiplicación del ADN. En definitiva, mayor agresividad de este subtipo tumoral.

Por otro lado, se halló que en los gliomas de bajo grado la IDH1 se expresa en menor nivel, y además, un elevado porcentaje de esta proteína se encuentra mutada en el aminoácido Arg132 del centro activo, por lo que no sólo no presentan menor actividad productora de NADPH sino que esta proteína adquiere una actividad diferente, obteniendo así una menor producción neta de NADPH. La menor producción de NADPH producido por la IDH1 normal y el consumo de éste por la enzima mutada al adquirir una nueva actividad, desprovee a la célula de su principal fuente de energía biosintética dando lugar a células menos proliferativas, y en consecuencia, a tumores de más bajo grado de malignidad.

Respecto a las diferencias entre centro y periferia dentro de cada grupo de estudio, se observó una mayor expresión del gen en la zona centro con respecto a la zona periférica, tanto en gliomas de alto grado como en gliomas de bajo grado. Aunque estos resultados concuerdan con la mayoría de estudios de expresión de otros genes, como el gen PEX estudiado por nuestro grupo<sup>29</sup>, reforzando la teoría de que en los gliomas existen áreas diferentes del tumor que pueden desarrollarse de manera independiente, en contra del concepto clásicamente aceptado del origen monoclonal de estas neoplasias<sup>30</sup> son necesarios más estudios para corroborar estos hallazgos.

Estos resultados recalcan la importancia de las diferencias moleculares dentro de los gliomas, y resaltan y dan a conocer nuestro modelo de estudio, único y crucial para la obtención de un diagnóstico certero. Así, los gliomas de alto grado presentan mayor porcentaje de IDH1 no mutada y con mayor grado de expresión de ARN mensajero, que concuerda con la mayor agresividad de este tipo de tumores. Mientras que los gliomas de bajo grado, además de presentar mayor frecuencia de IDH1 mutada, su expresión también se ve disminuida, conduciendo a una menor actividad normal de esta enzima, lo que concordaría con la menor agresividad de estos gliomas. La combinación novedosa de esta práctica quirúrgica y nuevos conocimientos moleculares ayudará a diseñar nuevas estrategias terapéuticas para estos tumores.



## Bibliografía

1. Louis et al 2001. American Journal of Pathology, Vol. 159, No. 3. Glioma Classification. A Molecular Reappraisal.
2. Parsons D.W. et al. 2008. Science. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.
3. Stupp, R. et al. 2005. N. Engl. J. Med. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.
4. Wen P. et al. 2008. N Engl J Med. Malignant Gliomas in Adults.
5. Balss J. et al. 2008. Acta Neuropathol 116:597-602. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors.
6. Yan H. et al. 2009. N Engl J Med. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.
7. Watanabe T. et al. 2009. Am J Pathol. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas.
8. Nekrutenko A. et al. 1998. Molec Biol Evol 15:1674-1684.
9. Ceccarelli, C. et al. 2002. J Biol Chem. Crystal structure of porcine mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase complexed with Mn<sup>2+</sup> and isocitrate. Insights into the enzyme mechanism.
10. Dubbink HJ. et al. 2009. Neurology. IDH1 mutations in astrocytomas predict survival but not response to temozolomide.
11. Sorlie T et al. 2001, Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:10869-74. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.
12. Valk PJ et al 2004. N Engl J Med ;350:1617-28. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia.
13. Nutt CL et al 2003. Cancer Res 63:1602-7. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification.
14. Shirahata et al 2007. Clin Cancer Re 13:7341-56. Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis.
15. Prados MD et al. 1993. Cancer Medicine. Philadelphia, London: Lea and Febiger 1993: 1080- 1119. Neoplasms of the central nervous system.
16. Molina F. et al. 2001. Sis San Navarra Vol. 24, Suplemento 1. Prognostic factors in brain tumours.
17. Cancer Genome Atlas research Network. Nature 2008;455:1061-8. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.
18. Ohgaki H et al 2007. Am J Pathol 170:1445-53. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma.
19. Furnari FB et al 2007. Genes Dev 21:2683-710. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment.
20. Weber RG et al. 1996. Oncogene 13:983-94. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization.
21. Bigner SH et al. 1999. Am J Pathol 155: 375-86. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization.
22. Yan H et al. 2009. Cancer Res 69(24): 9157-9159. Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas.
23. Burger PC et al 2000. IARC Press. Pathology and genetics of tumors of the nervous system.
24. Nutt CL et al. 2003. Cancer Res 63:1602-7. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification.
25. Bellail AC. et al. 2004. Int J Biochem Cell Biol 36:1046-69. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion.
26. Hoelzinger DB. 2005. Neoplasia 7:7-16. Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets.
27. Bello L. et al. 2001. Cancer Research 61: 8730-6. Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2.
28. Santandreu F.M. et al. 2008. Cell Physiol Biochem 22: 757-68. Differences in mitochondrial function and antioxidant systems between regions of human glioma.
29. Brell M. et al. 2010. Brain Tumor Pathol. Quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 mRNA expression in central and peripheral regions of gliomas.
30. Ren ZP. Et al. 2007. J Neuropathol Exp Neurol. 66: 944-54. Molecular genetic analysis of p53 intratumoral heterogeneity in human astrocytic brain tumors.

